

Tıbbi sülük (*Hirudo verbana*)’den izole edilen *Aeromonas* spp. suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve çoklu antibiyotik direnç (ÇAD) indeks sonuçları

Determination of antibiotic susceptibilities of *Aeromonas* spp. strains isolated from medicinal leech (*Hirudo verbana*) and multiple antibiotic resistance (MAR) index results

ÖZET

Bu çalışmanın amacı tıbbi sülük (*Hirudo verbana*)’den izole edilen hareketli *Aeromonas* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarını, Çoklu Antibiyotik Direnç (ÇAD) indekslerini ve plazmitlerin varlığını araştırmaktır. Suşların antibiyotik duyarlılıkları (ampisilin, kanamisin, kloramfenikol, nalidiksik asit, streptomisin, tetrasiklin, trimetoprim ve trimetoprim+sülfametoksazol) standart disk difüzyon tekniği ile belirlenmiştir. Plazmit izolasyonu manuel olarak tespit edilmiştir. Suşların Çoklu Antibiyotik Direnç (ÇAD) indeksleri hesaplanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, suşların en az bir antibiyotiğe karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen suşlar plazmit içermiştir.

Anahtar kelimeler: Tıbbi sülük, *Hirudo verbana*, *Aeromonas*, ÇAD, plazmit.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the antimicrobial susceptibility, Multiple Antibiotic Resistance (MAR) indices and the presence of plasmids of motile *Aeromonas* strains isolated from medicinal leech (*Hirudo verbana*). Antibiotic susceptibilities of the strains (ampicillin, kanamycin, chloramphenicol, nalidixic acid, streptomycin, tetracycline, trimethoprim and trimethoprim+sulphamethoxazole) were determined by standard disc diffusion technique. The plasmid isolation was determined by manually. The Multiple Antibiotic Resistance (MAR) index of the strains was calculated. According to the study results, it was determined that the strains were resistant against one antibiotic. The isoalted strains contained plasmids.

Keywords: Carp, Fiber Tank, Net Cage, Polyculture, Grass carp, Mirror carp.

GİRİŞ

Sülükler sucul ve karasal çevrelerde bulunan, karnivor ve segmentli kurtlar olup Annelida filumu, Clitellata sınıfında yer alırlar (Tripthi ve Ashalatha, 2015; Ayhan ve Mollahaliloğlu, 2018). Hirudinea alt sınıfında yer alan sülükler ise genel olarak deniz, tatlı su ve kara sülükleridir (Gödekmerdan vd., 2015). Sülüklerin bir kısmı kan emici olup bu grupta yer alan sülükler insan, evcil hayvanlar, balık, kurbağa, kaplumbağa ve yılan gibi çeşitli canlılar üzerinde dış parazit şeklinde yaşarlar (Gödekmerdan vd., 2015; Sağlam, 2018). Tipik olarak sülüğün vücudu dorsaventral şekilde yassılaştırılmıştır. Vücudunun ön ve arka kısımlarında yer alan segmentler farklılaşarak ön ve arka çekmen halini almıştır (Sig vd., 2017). Ön çekmen çok dişli üç çeneye sahipken, arka çekmen ise sülüğün yüzeye tutunmasına ve hareket etmesine yardımcı olur (Tripthi ve Ashalatha, 2015; Ayhan ve Mollahaliloğlu, 2018). Tıbbi sülüklerin kullanıldığı bir tedavi yöntemi olan hirudoterapi ilk kez Çinliler tarafından onuncu yy başlarında uygulanmıştır.

How to cite this article

Korun, J., Ulutaş, A. ve Gökoğlu, M. (2019) Tıbbi sülük (*Hirudo verbana*)’den izole edilen *Aeromonas* spp. suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve Çoklu Antibiyotik Direnç (ÇAD) indeks sonuçları. *J Adv VetBio Sci Tech*. 4(2): 59-66. <http://doi.org/10.31797/vetbio.534867>

Research Article

Jale Korun¹
Aycan Ulutaş²
Mehmet Gökoğlu³

Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri
Fakültesi Kampüs Arapsuyu – Antalya /
Türkiye

¹ ORCID: 0000-0002-1930-9978

² ORCID: 0000-0002-4892-6326

³ ORCID: 0000-0001-9723-8581

Correspondence

Prof. Dr. Jale Korun
jalekorun@akdeniz.edu.tr

Article info

Submission: 03-03-2019

Accepted: 12-05-2019

Online published: 08-08-2019

published: 31-08-2019

This work is licensed under a Creative
Commons Attribution 4.0 International
License



e-ISSN: 2548-1150

website: <http://dergipark.gov.tr/vetbio>

doi prefix: [10.31797/vetbio](http://doi.org/10.31797/vetbio).

Hirudoterapinin popülaritesi 1884 yılında sülük salgısında bulunan ve antikoagülant özelliği olan hirudin keşfi ile artmıştır (Gönce, 2000). Bununla birlikte, hirudoterapinin enfeksiyon gibi çeşitli komplikasyonlara yol açabileceği de bildirilmiştir (Litwinowicz ve Blaszkowska, 2013). Başta *Aeromonas* spp. olmak üzere Gram-negatif bakteri türleri enfeksiyona neden olurken, tıbbi sülüklerin bağırsak florası üzerine yapılan çalışma sonuçlarına göre *A. hydrophila* ve *A. veronii* biovar *sobria* türlerinin sülüğün sindirim kanalındaki baskın türler olduğu ortaya koyulmuştur (Litwinowicz ve Blaszkowska, 2013; Verriere vd., 2016; Ruppé vd., 2018). *Aeromonas* türleri Aeromonadaceae familyasında yer alan *Aeromonas* cinsinin üyeleri olup bu türler fakültatif anaerobik, spor oluşturmeyen, çomak şekilli Gram-negatif basillerdir. *Aeromonas* türleri psikrofilik ve mezofilik olmak üzere iki gruba ayrılır. Mezofilik türler insanlarda ve balık gibi soğuk kanlı canlılarda enfeksiyona neden olur (Elal Muş ve Çetinkaya, 2013; Furmanek Blaszk, 2014; Samal vd., 2014). Dünya genelinde ciddi bir sorun haline gelen bakteriyel enfeksiyonları tedavi edebilmek amacı ile çeşitli antibiyotikler geliştirilmiştir. Bununla birlikte, bakteriler zamanla antibiyotiklere karşı mutasyon ya da direnç belirleyicilerinin kazanılması sonucu dirençli hale gelmiştir (Kumar ve Varela, 2013). Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'ne göre, mikroorganizmaların orijinal olarak hassas oldukları bir ya da birden fazla antibiyotiğe karşı direnç gösterme, antibiyotik direnci şeklinde tanımlanmaktadır. Bakterilerde gelişen bu direnç başta insan sağlığı olmak üzere tarım ve endüstride ciddi sorunlara neden olabilmektedir (Zhou vd., 2015). Bir bakteri türünün antibiyotiğe duyarlı olması, önerilen dozlar ile yapılan enfeksiyon tedavisinde o bakteri türünün gelişmesini ve/veya üremesini önleyebileceğini gösterirken, dirençli olması ise antibiyotiğin normal dozlarda o bakteri türünün gelişmesini ve/veya üremesini önleyemeyeceği (Kusdarwati vd., 2017) anlamına gelmekle birlikte, antibiyotiğe karşı dirençli olma bakterinin bir özelliği olup direnç doğal veya kazanılmış direnç şeklinde iki gruba ayrılmaktadır (Öztürk, 2002; Ekici ve Yarsan, 2008). Birçok gram-negatif bakteri türü hücre duvarı yapıları sebebi ile

metisilin ve vankomisine doğal direnç gösterirken, enterokok türü bakteriler ise sefalosporinlere karşı doğal direnç gösterir (Öztürk 2002). *Aeromonas* türlerinin antibiyotiklere olan duyarlılıklarında belirgin farklar görülmekle birlikte dünya genelinde türlerin ampisilin, penisilin gibi beta laktamlara karşı dirençli oldukları kabul edilmekle birlikte, pek çok *Aeromonas* türünün kloramfenikol, tetrasiklin, trimetoprim-sülfametoksazol ve nalidiksik aside duyarlı olduğu bildirilmiştir (Awan vd., 2009; Joseph vd., 2013). Bu türlerin penisilinlere ve diğer antibiyotiklere direnci, türlerde plazmitlerin bulunuşu ile açıklanmıştır (Awan vd., 2009). Balık, balık dışı gıda örnekleri ve su dahil farklı kaynaklardan izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinin antimikrobiyal duyarlılıklarının yoğun olarak çalışılmasına (Altanlar vd., 2003; Awan vd., 2009) karşın tıbbi sülükten izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinin antimikrobiyal duyarlılıkları yoğun olarak çalışılmamıştır. Mevcut çalışmalar ise genellikle sülükten izole edilen türlerin hirudoterapi açısından insan sağlığına yönelik antimikrobiyaller üzerine dayandırılmıştır (Eroğlu vd. 2000; Whitaker vd., 2014; Verriere vd., 2016). Bu çalışmanın amacı bir su canlısı olan tıbbi sülük (*Hirudo verbana*)'den izole edilen *Aeromonas* spp. suşlarının kültür balıkçılığında kullanılagelen antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesi, plazmit çalışması ve Çoklu Antibiyotik Direnç (ÇAD) indeks sonuçlarının değerlendirilmesidir.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada altı adet ve ortalama vücut ağırlığı 5.86 g olan sülük örnekleri ile çalışılmıştır. Bakteriyolojik çalışma öncesi sülükler anestezi madde olarak 2-fenoksi etanol kullanılarak anestezileri yapılmıştır. Anestezi sonrası sülüklerin vücut yüzeyleri %70'lik etanol ile silinmiş ve steril atılabilir öze kullanılarak vücut yüzeyinden örnek alınarak beyin kalp infüzyon buyyona (BHIB) ekimleri yapılmıştır. Sülüklerin karın kısımlarına sagittal kesim yöntemi uygulanarak bağırsak ortaya çıkartılmıştır. Bağırsaktan steril atılabilir öze ile örnekler alınarak BHIB'a ekimleri yapılmıştır. Sülüklerin ağız kısımlarından da aynı şekilde örnek alınarak BHIB'a ekimleri yapılmıştır. Ekimli besiyerleri 25 ± 2 °C de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda sıvı besiyerinden 1 µl alınarak Beyin Kalp İnfüzyon

Agar (BHIA)'lı besiyeri yüzeyine yayılmış ve ekimli tüm petri kutuları 25 ± 2 °C de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir (Eroğlu vd., 2000; Jaberî vd., 2014). Bu süre sonunda besiyerleri incelendiğinde krem renkli, yuvarlak, konveks ve opak bakteri kolonilerinin geliştiği gözlenmiştir. İzole edilen suşlara hareket, Gram boyama, O/F fermentasyon, sitokrom oksidaz ve katalaz testleri ile O/129 vibriostat (10 µg ve 150 µg) uygulanmıştır. Suşların tanımlanmasında hızlı tanı ticari kit olan API20 E (BioMerieux, Fransa) kullanılmıştır. Bakteri suşlarının antibiyotik duyarlılıkları standart disk difüzyon tekniği ile tespit edilmiştir. Kısaca, 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan 0.1 ml alınarak Mueller-Hinton Agar (MHA)'lı petrilerin yüzeyine yayılmış ve 10 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra besiyeri yüzeyine antibiyotik diskleri yerleştirilerek 24 ± 2 °C de 16-18 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon

süresi sonunda disklerin etrafındaki zon çapları ölçülerek değerlendirilmiştir (CLSI, 2006). Testler iki tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır. Çalışmada Ampisilin (AMP 10 µg), Kanamisin (K 30 µg), Kloramfenikol (C 30µg), Nalidiksik asit (NA 30µg), Streptomisin (S 10µg), Tetrasiklin (TE 30µg), Trimetoprim (W 5µg) ve Trimetoprim-Sülfametoksazol (SXT 25µg) ticari antibiyotik diskleri (Oxoid) kullanılmıştır. EUCAST (2018) de *Aeromonas* spp. için tüm antibiyotikleri kapsayabilmesi amacı ile Kalite Kontrol (KK) suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 suşunun antibiyotik duyarlılık çalışmalarına dahil edilmesi önerilmiştir. Bu nedenle, CLSI (2006) ve EUCAST (2018)'in önerileri dikkate alınarak, antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi çalışmalarına *E. coli* ATCC 25922 KK suşu da dahil edilmiştir. Tablo 1 de çalışmada kullanılan antibiyotikler ile KK suşu için tespit edilen zon çapı sınır değerleri verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan antibiyotikler ile *Escherichia coli* ATCC 25922 KK suşu için tespit edilen zon çapı sınır değerleri (mm).

Table 1. Zone diameters (mm) determined for *Escherichia coli* ATCC 25922 QC strain with antibiotics used in the study.

Antibiyotik	Disk içeriği (µg)	<i>E. coli</i> ATCC 25922*	
		<i>E. coli</i> ATCC 25922*	<i>E. coli</i> ATCC 25922**
		İnhibisyon zon çapı (mm)	
		Aralık	Aralık
Ampisilin (AMP)	10	15-22	15-22
Kanamisin (K)	30	-	17-25
Kloramfenikol (C)	30	21-27	21-27
Nalidiksik asit (NA)	30	22-28	22-28
Streptomisin (S)	10	-	12-20
Tetrasiklin (TE)	30	-	18-25
Trimetoprim (W)	5	21-28	21-28
Trimetoprim-Sülfametoksazol (SXT)	25	23-29	23-29

E. coli ATCC 25922 için *EUCAST (2018) ve **CLSI (2017) referans alınmıştır.

Çalışmada suşların antibiyotik duyarlılıkları tespit edildikten sonra suşlar arasında direnci yüksek olan 5 suş plazmit çalışmalarında kullanılmıştır. Suşlardan plazmit DNA izolasyonu, kit kullanılmadan Tekdal (2009) ve Avşar vd. (2016)'a göre yapılmıştır. TSA da gelişme gösteren *Aeromonas* spp. kolonilerinden alınarak Luria Bertani (LB) sıvı besiyerine ekimleri yapılmıştır. 37 °C de bir gece inkübasyon sonrasında kültürden 1.5 ml alınarak santrifüj tüplerine aktarılmış ve soğutmalı santrifüjde 10000 rpm de 1 dakika santrifüj yapılarak

çöktürülmüştür. Üsteki sıvı kısım (süpernatant) dökülerek bakteriyel pelet üzerine 100 µl soğuk çözelti I (25 mM Tris-HCL (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0) ve 50 mM glikoz) solüsyonu ile karıştırılıp çözdürülmüş ve üzerine 200 µl çözelti II (SDS eriyiği: %1 SDS ve 0.2 N NaCl) eklenerek buzda 15 dakika süre ile bekletilmiştir. Santrifüj sonrasında üsteki süpernatant alınarak temiz bir tüpe aktarılmış ve üzerine 1 hacim fenol:kloroform (1:1) eklenerek karıştırılmıştır. Karıştırma sonrası tüpler tekrar 10000 rpm de 5 dakika süre ile santrifüj edilerek üsteki süpernatant alınmış ve

üzerine iki hacim olacak şekilde saf etanol eklenerek buz üzerinde bekletilmiştir. Süre sonunda 10000 rpm de 10 dakika süre ile santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası üsteki süpernatant dökülerek pelet kısım %70'lik soğuk etanol ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası alkol uzaklaştırılarak kuruması beklenmiş ve üzerine 50 µl TE (10 mM Tris-EDTA (pH 8.0) solüsyonu eklenerek kullanılabilecek kadar -20 °C de muhafaza edilmiştir. Plazmit DNA'ları %0.7 agaroz jel elektroforez yöntemi ile analiz edilerek varlıkları ve sayıları tespit edilmiştir. Bakteri suşlarının antibiyotik duyarlılıkları tespit edildikten sonra suşların Çoklu Antibiyotik Dirençlilik (ÇAD) indeksi de hesaplanmıştır. ÇAD indeksi test edilen suşların dirençli olduğu antibiyotik sayısı (a)'nın çalışmada denenen toplam antibiyotik sayısı (b)'na oranı ile bulunmuştur (Ehinmidu, 2003). Çalışmada ÇAD değerleri her bir suş için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

BULGULAR

Bakteriyolojik ekim çalışmalarında sülük örneklerinden 9 bakteri suşu izole edilmiştir. Suşların hepsi Gram-negatif, hareketli, fermentatif, sitokrom oksidaz ve katalaz pozitif olup suşların O/129 vibriostat (10 µg ve 150 µg) testlerine dirençli oldukları bulunmuştur. Suşlar Cipriano ve Austin (2011)'e göre *Aeromonas* spp. olarak tanımlanmıştır. Suşların API 20E hızlı tanı kiti sonuçları Awan vd. (2005)'in *Aeromonas caviae*

için bildirdikleri API 20E test sonuçları ile karşılaştırıldığında çalışmada izole edilen 9 suşun *A. caviae* ile uyumlu olduğu anlaşılabilir, suşlar *A. caviae* suşları şeklinde tanımlanmıştır.

Çalışmada suşların antibiyotik duyarlılıkları standart disk difüzyon tekniği ile tespit edilerek suşların farklı antibiyotiklere olan duyarlılık ve/veya direnç durumlarının suşa bağlı olarak değiştiği anlaşılmıştır. Suşların hepsi ampiciline dirençli iken suşların streptomisine ise duyarlı oldukları bulunmuştur. Suşların kanamisin, kloramfenikol, nalidiksik asit, tetrasiklin, trimetoprim ile trimetoprim-sülfametoksazole duyarlılık durumları ise suşlar arasında farklılık göstermiştir. Çalışmada izole edilen dokuz suştan 2'sinin kanamisine duyarlı olduğu, 3 suşun dirençli ve 4 suşunda orta dirençli olduğu tespit edilmiştir. İki suşun nalidiksik aside dirençli olduğu 7 suşun ise duyarlılık gösterdiği bulunmuştur. İki suş tetrasikline dirençli iken, 2 suşun orta dirençli ve 5 suşun da duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Dokuz suştan 6'sı trimetoprime duyarlı iken, 3 suş dirençli olarak, 6 suşun trimetoprim-sülfametoksazole dirençli ve 3 suşun ise duyarlı olduğu bulunmuştur. Tablo 2 de suşların antibiyogram test sonuçları ve Tablo 3 de suşların antibiyotik duyarlılıklarının tespitinde karşılaştırma amaçlı kullanılan Kalite Kontrol suşu *E. coli* ATCC 25922'nin antibiyogram test sonuçları verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada izole edilen *A. caviae* suşlarının antibiyogram test sonuçları ve ÇAD indeks değerleri.
Table 2. The MAR index and antibiogram test results of *A. caviae* strains isolated in the study.

Antibiyotik	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
AMP	D	D	D	D	D	D	D	D	D
K	20(H)	15(D)	16(I)	15(D)	16(I)	16(I)	14(D)	16(I)	17(H)
C	D	30(H)	30(H)	15(D)	27(H)	27(H)	D	33(H)	31(H)
NA	15(D)	35(H)	30(H)	25(H)	32(H)	32(H)	16(D)	36(H)	30(H)
S	20(H)	12(H)	17(H)	18(H)	16(H)	15(H)	17(H)	13(H)	18(H)
TE	15(D)	18(H)	17(I)	30(H)	18(H)	15(D)	17(I)	18(H)	20(H)
W	D	28(H)	28(H)	D	28(H)	24(H)	15(D)	28(H)	30(H)
SXT	7(D)	27(H)	14(D)	D	28(H)	12(D)	8(D)	23(H)	15(D)
ÇAD	0.75	0.25	0.5	0.625	0.25	0.5	0.875	0.25	0.25

AMP: Ampisilin, K: Kanamisin, C: Kloramfenikol, NA: Nalidiksik asit, S: Streptomisin, TE: Tetrasiklin, W: Trimetoprim, SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol, H: Duyarlı, D: Dirençli, I: Orta dirençli.

Tablo 3. *E. coli* ATCC 25922 (KK)'nin antibiyogram test sonuçları.
Table 3. Antibiogram test results of *E. coli* ATCC 25922 (QC).

Antibiyotik	<i>E. coli</i> ATCC 25922 (KK)
AMP	16(H)
K	28(H)
C	25(H)
NA	30(H)
S	21(H)
TE	30(H)
W	34(H)
SXT	28(H)

AMP: Ampisilin, K: Kanamisin, C: Kloramfenikol, NA: Nalidiksik asit, S: Streptomisin, TE: Tetrasiklin, W: Trimetoprim, SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol, H: Duyarlı.



Şekil 1. Suşların plazmit analiz sonuçları (M: Marker, Fisherscientific).

Figure 1. Plasmid analyses results of the strains (M: Marker, Fisherscientific).

Çalışmada beş suşun plazmit taşıdığı, 2 suş dışında diğer 3 suşun plazmit profilinin benzer olduğu ve diğer 2 suşun ise farklı plazmit profili gösterdiği ve plazmit büyüklüklerinin 24 kbp üzerinde olduğu anlaşılmıştır (Şekil 1).

Suşların duyarlı veya dirençli oldukları antibiyotikler tespit edildikten sonra suşların ÇAD indeks değerleri de hesaplanmıştır. Tablo 2 incelendiğinde suşların ÇAD indeks değerlerinin

suşa bağlı olarak değiştiği anlaşılmıştır. Suşların ÇAD indeks değerleri en düşük 0.25, en yüksek 0.875 olarak hesaplanmıştır.

TARTIŞMA

Mezofilik, hareketli *Aeromonas* türleri sucul çevrelerde doğal olarak bulunmakla birlikte, timsah, balık gibi soğuk kanlı hayvanlardan, et ürünleri, pastörize ve pastörize edilmemiş süt, klorlu ve klorsuz sulardan, içme ve kuyu

sularından, deniz, nehir ve tatlı su kaynaklarından, deniz ürünleri ile bağışıklık sistemi zayıflamış bireyler olmak üzere çeşitli kaynaklardan izole edilmiştir (Goñi-Urriza vd., 2000; Yücel vd., 2005; Odeyemi ve Ahmad, 2017). Bu çalışmada tıbbi sülük, *H. verbana*'dan hareketli *Aeromonas* suşları izole edilmiştir.

Hatha vd. (2005) farklı tatlı su balık türlerinden izole ettikleri *Aeromonas* türlerinin hepsinin ampisiline direnç gösterdiklerini, suşların %40'nın oksitetrasikline ve %10'unun ise nalidiksik aside dirençli olduğunu bildirmiştir. Çalışmada suşların hepsinin streptomisine duyarlı olduğu, kloramfenikole ise direncin düşük (< %20) olduğu tespit edilmiştir.

Jagoda vd. (2014) izole ettikleri 53 *Aeromonas* izolatının 8 antimikrobiyeye karşı duyarlılıklarını çalıştıkları çalışmalarında, suşların amoksisiline (beta-laktam antibiyotikleri) karşı dirençli olma durumlarının dışında tetrasiklin ile eritromisine en yüksek direnci gösterdiklerini, suşların %84.9'unun enrofloksasine, %81.1'inin kloramfenikole, %77.3'ünün neomisine ve %77.7'sinin sülfametoksazol-trimetoprim'e duyarlı olduğunu ve 53 izolattan 26'sında (%49) test edilen antibiyotiklere karşı çoklu direncin söz konusu olduğunu bildirmiştir.

Altanlar vd. (2003) çalışmalarında kuyu suyu örneklerinden izole ettikleri 66 hareketli *Aeromonas* suşunun hepsinin (%100) ampisiline ve eritromisine dirençli olduğunu, suşların siprofloksazin, sefalozin, sefaksim ve kuvvetlendirilmiş sülfonamidlere (trimetoprim+sülfametoksazol) duyarlı olduğunu bildirmiştir.

Odeyemi ve Ahmad (2017) 16'sı deniz hıyarı, 14'ü deniz suyu, 13'ü sediment ve 10'u bivalve olmak üzere çeşitli kaynaklardan 53 *Aeromonas* suşunu izole ve tanımlamıştır. İzolatlar arasında çoklu antibiyotik direnci bulunmuştur. 53 izolattan 53 (%100)'ünün ampisilin, novobiosin, sülfametoksazol ve trimetoprim'e dirençli olduğu, 53 suştan 24 (%45.3)'ünün nalidiksik aside, 49 (%92.5)'ünün penisiline, 25 (%47.2)'inin streptomisine dirençli olduğu tespit edilmiştir. Suşlar arasında en düşük direnç kanamisin ve gentamisine karşı gözlenmiştir. Bununla birlikte, izolatların hepsinin (53, %100) tetrasikline duyarlı

olduğu, suşlar arasında gentamisin ile oksitetrasikline duyarlılığın farklılık gösterdiği anlaşılmıştır. Bivalve ve deniz suyundan izole edilen 24 suşun hepsinin kanamisin, gentamisin, oksitetrasiklin ve tetrasikline, sedimentten izole edilen 13 *Aeromonas* izolatının ise kanamisin, gentamisin ve tetrasikline duyarlı olduğu bildirilmiştir. Deniz hıyarından izole edilen suşlar ise sadece tetrasikline duyarlılık göstermiştir. Çalışmada 53 *Aeromonas* suşunun ÇAD indeksi 0.25 ve 0.68 arasında değişmiştir.

Mevcut çalışmada sülükten izole edilen 9 *Aeromonas* suşunun beta-laktam antibiyotikleri arasında yer alan ampisiline direnç gösterdiği tespit edilmiş ve bu sonuç Altanlar vd. (2003), Hatha vd. (2005), Jagoda vd. (2014) ile Odeyemi ve Ahmad (2017)'nin sonuçları ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır. Çalışmada suşlar (%100) streptomisine duyarlılık göstermiştir. Hatha vd. (2005) çalışmalarında *Aeromonas* suşlarının (%100) streptomisine duyarlı olduğunu bildirerek, bu sonuç, bizim sonuçlarımız ile uyumluluk göstermiştir. Sülükten izole edilen suşların %77.7'si nalidiksik aside, %66.6'sı tetrasikline duyarlılık gösterirken, %66.6'sı ise trimetoprim+sülfametoksazole direnç göstermiştir. Hatha vd. (2005) çalışmalarında suşların %90'nın nalidiksik aside duyarlı, Odeyemi ve Ahmad (2017) deniz hıyarından izole edilen suşların (%100) tetrasikline duyarlı olduğunu bildirmiştir. Sülfam, trimetoprim, makrolidler ve florid kinolonlar gibi ilaçlar su kütlelerinde yaygın olarak bulunmakla birlikte, tetrasiklin ve siprofloksasin gibi hidrofobik antibiyotikler suda mevcut diğer partiküllere kolaylıkla tutunabilirler (Freitas vd., 2018). Mevcut çalışmada diğer araştırmacıların çalışmalarında olduğu gibi sülükten izole edilen suşların genel olarak direnç gösterdikleri ampisilin dışında, birden fazla antibiyotiğe değişen derecelerde direnç göstermelerinde Freitas vd. (2018)'in bildirdiği bazı antibiyotiklerin hidrofobik özellikleri etkili olabilir.

Antimikrobiyal direnç ve virülens faktörleri gibi bakteriyel fenotipik özellikler plazmit tarafından kodlanmaktadır. Bakteri suşlarında plazmitlerin bulunması klinik olarak önemli bakteri türlerinin virülens özelliklerini arttırmaktadır. Bu nedenle, bakterilerde

plazmitlerin bulunması potansiyel sağlık riskine yol açmaktadır (Abdulhamd, 2010). Freitas vd. (2018) çalışmalarında 77 izolattan 14'ünün plazmit içerdiğini ve bunlardan 8'inin kromozomal DNA'dan daha büyük mega plazmitleri içerdiğini bildirmiştir. Abdulhamd (2010) 10 hareketli *Aeromonas* suşundan plazmit izole ederek, suşların hepsinin plazmit içerdiğini ve bu plazmitlerin boyutlarının 1.5 kb ile 16.0 kb arasında değiştiğini bildirmiştir. Çalışmamızda sülüklerden izole ettiğimiz *Aeromonas* suşlarının plazmit analizlerinde suşların plazmit içerdiği ve Abdulhamd (2010) ile Freitas vd. (2018) çalışmalarındaki sonuçlara benzer şekilde plazmit boyutlarının büyük olduğu anlaşılmıştır.

Joseph vd. (2013) farklı kaynaklardan izole ettikleri *Aeromonas* suşlarında, suşların %20'sinin ÇAD indeks değerlerinin > 0.2 olduğunu bildirerek, bu değer yüksek çevre riskinin göstergesi olduğunu bildirmiştir. Odeyemi ve Ahmad (2017) *Aeromonas* suşlarında ÇAD indeksinin 0.25 ile 0.68 arasında değiştiğini bildirmiştir. Bu çalışmada 9 *Aeromonas* suşunun ÇAD indeks değerleri yukarıda belirtilen araştırmacılarınkine benzer şekilde yüksek bulunmuştur.

SONUÇ

Çalışmada tıbbi sülük (*Hirudo verbana*)'dan 9 hareketli *Aeromonas* suşu izole ve identifiye edilmiştir. Sülükten izole edilen bakteri türlerinin antibiyotik duyarlılığı, plazmit varlığı ve ÇAD (Çoklu Antibiyotik Direç) indeks değerlerinin incelendiği bu çalışmada suşların beta-laktam antibiyotiklere olan (ampisilin) direnç durumları dışında birden fazla antibiyotiğe dirençli olarak ve ÇAD indeks değerleri ise > 0.2 'den yüksek bulunmuştur. Suşlar ayrıca plazmit içermiştir. Tıbbi sülükler Hirudoterapide kullanılmakla birlikte, hareketli *Aeromonas* türleri sülüklerin sindirim kanalındaki baskın bakteri türleri arasında yer almaktadır. Çalışmada izole edilen *Aeromonas* suşlarının direnç durumları değerlendirildiğinde Freitas vd. (2018) tarafından bildirildiği gibi sülfam, trimetoprim, makrolidler ve florid kinolonlar gibi ilaçlar su kütlelerinde yaygın olarak bulunmakla birlikte, tetrasiklin ve siprofloksasin gibi hidrofobik antibiyotikler suda mevcut diğer partiküllere kolaylıkla tutunabilmeleri sonucu, bu

suşlarda direnç artışına neden olmuş olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdulhamd, A. (2010).** Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of motile aquatic aeromonads. *IJCEA*, 1(1), 90-96.
- Altanlar, N., Yücel, N., Akın, A. (2003).** Occurrence and antibiotic susceptibility of motile *Aeromonas* spp. of untreated well water. *J Fac Pharm, Ankara*. 32(3), 151-157.
- Avşar, C., Berber, İ., Yıldırım, A K. (2016).** Sinop ilindeki hamsi ve zargana balıklarından *Vibrio* spp. izolasyonu ve karakterizasyonu. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 73(2), 121-130.
- Awan, M. B., Maqbool, A., Bari, A., Krovacek, K. (2009).** Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* spp. isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *New Microbiol*, 32, 17-23.
- Ayhan, H., Mollahaliloğlu, S. (2018).** Medicinal leech therapy. *Ankara Med J*, 20(1), 141-148.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2006).** Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; approved guideline, CLSI document M42-A, 26(23), USA.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2017).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed., CLSI Supplement M100, USA.
- Ehinmidu, J.O. (2003).** Antibiotics susceptibility patterns of urine bacterial isolates in Zaria, Nigeria. *Trop J Pharm Res*, 2(2), 223-228.
- Ekici, H., Yarsan, E. (2008).** Antibiyotiklere direnç ve dirençliliğin boyutlarının çok yönlü değerlendirilmesi. *Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi*, 3-4, 85-93.
- Elal Muş, T., Çetinkaya, F. (2013).** Perakende su ürünlerinde *Aeromonas hydrophila* varlığının araştırılması. *Uludağ Univ J Fac Vet Med*, 32(1), 7-10.
- Eroğlu, C., Hökelek, M., Güneren, E., Sünbül, M., Aydoğan, S., Uysal, O.A. (2000).** Plastik cerrahide kullanılan sülük (*Hirudo medicinalis*)'lerden izole edilen *Aeromonas hydrophila*'ların antibiyotik duyarlılıkları. *15. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi*, Antalya, 551-553.
- EUCAST (2018).** The European committee on antimicrobial susceptibility testing routine and extended international quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 8.0.
- Freitas, M.R., Freire, N.B., Peixoto L.J.S., Oliveira, S.T.L., Souza, R.C., Gouveia, J.J.S., Costa, M.M., Gouveia, G.V. (2018).** The presence of plasmids in *Aeromonas hydrophila* and its relationship with

- antimicrobial and heavy metal-resistance profiles. CR, 49(9), e20170813, 1-6.
- Furmanec-Blaszczak, B. (2014).** Phenotypic and molecular characteristics of an *Aeromonas hydrophila* isolated from the River Nile. Microbiol Res, 169, 547-552.
- Goñi-Urriza, M., Pineau, L., Capdepy, M., Roques, C., Caumette, P., Quentin, C. (2000).** Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. J Antimicrob Chemother, 46, 297-301.
- Gödekmerdan, A., Arusan, S., Bayar, B., Sağlam, N. (2015).** Tıbbi sülükler ve hirudoterapi. Türkiye Parazitol Derg, 35, 234-239.
- Gönenç, B. (2000).** Sülüklerin genel özellikleri, patojenite ve tedavi şekilleri. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 6(1-2), 137-144.
- Hatha, M., Vivekanandhan, A. A., Julie, A., Christol, J. (2005).** Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water. Int J Food Microbiol, 98, 131-134.
- Jaberi, S., Rahmena, M., Shapouri, R. (2014).** Determine of the microbial flora of leeches in North of Iran and designing antimicrobial solution to sterile the leeches. JABS, 8(3), 42-45.
- Jagoda, S.S.S.S., Wijewardana, T. G., Kinoshita, S., Watabe, S., Asakawa, S. (2014).** Characterization and antimicrobial susceptibility of motile aeromonads isolated from freshwater ornamental fish showing signs of septicemia. Dis Aquat Org, 109, 127-137.
- Joseph, A.V., Sasidharan, R.S., Nair, H.P., Bhat, S.G. (2013).** Occurrence of potential pathogenic *Aeromonas* species in tropical seafood, aquafarms and mangroves off Cochin coast in South India. Vetworld, 300-306.
- Kumar, S., Varela, M.F. (2013).** Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. Formatex, 552-534.
- Kusdarwati, R., Rozi, D., Dinda, N., Nurjanah, I. (2017).** Antimicrobial resistance prevalence of *Aeromonas hydrophila* isolates from motile *Aeromonas* septicemia disease. Asean-Fen International Fisheries Symposium, 1-6.
- Litwinowicz, A., Blaskowska, J. (2013).** *Hirudo verbana* is a source of fungal isolates potentially pathogenic to humans. Afr J Microbiol Res, 7(47), 5358-5363.
- Odeyemi, O.A., Ahmad, A. (2017).** Antibiotic resistance profiling and phenotyping of *Aeromonas* species isolated from aquatic sources. Saudi J Biol Sci, 24, 65-70.
- Öztürk, R. (2002).** Antimikrobik ilaçlara karşı direnç geliştirme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu. Akılcı antibiyotik Kullanımı ve Erişkinlerde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi, 31, 83-100.
- Ruppé, E., Cherkaoui, A., Wagner, N., La Scala, G.C., Beaulieu, J.Y., Girard, M., Frey, J., Lazarevic, V., Schrenzel, J. (2018).** In vivo selection of a multidrug resistant *Aeromonas salmonicida* during medicinal leech therapy. New Microbes New Infect, 21, 23-27.
- Sağlam, N. (2018).** The effects of environmental factors on leeches. AAE, 1(1), 1-3.
- Samal, S.K., Das, B. K., Pal, B. B. (2014).** Isolation, biochemical characterization, antibiotic susceptibility study of *Aeromonas hydrophila* isolated from freshwater fish. IJCMAS, 3(12), 259-267.
- Sig, A.K., Güney, M., Üsküdar Güçlü, A., Özmen, E. (2017).** Medicinal leech therapy an overall perspective. IMR, 6, 337-343.
- Tekdal, D. (2009).** *Spirulina platensis* (Cyanophyta)'e elektroporasyon yolu ile gen aktarım olanaklarının araştırılması. Adana, Türkiye, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, 96 sayfa.
- Tripathi, P.S., Ashalatha, M. (2015).** Hirudotherapy-modern twist to ancient science and its relevance in maxillofacial region-a review. IJISR, 20(1), 141-148.
- Verriere, B., Sabatier, B., Carbonelle, E., Mainardi, J.I., Prognon, P., Whitaker, I., Lantieri, L., Hivelin, M. (2016).** Medicinal leech therapy and *Aeromonas* spp. infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 35, 1001-1006.
- Whitaker, I.S., Maltz, M., Siddall, M.E., Graf, J. (2014).** Characterization of the digestive tract microbiota of *Hirudo orientalis* (medicinal leech) and antibiotic resistance profile. Plastic and Reconstructive Surgery. 193(3), 408e-418e.
- Yücel, N., Ashım, B., Bayatlı, Y. (2005).** Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species isolated from retail fish in Turkey. J Food Quality, 28, 313-324.
- Zhou, G., Shiq S., Huang, X.M., Xie, X.B. (2015).** The three bacterial lines of defense against antimicrobial agents. Int J Mol Sci, 16, 21711-21733.